

# Cøliaki

*En revolusjon i jakten på kandidatgener*

**Stian Døvik**

kull H04



En prosjektoppgave ved Det Medisinske Fakultet

Veileder: Ludvig M. Sollid

UNIVERSITETET I OSLO

Oktober 2009

# Innhold

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
0.1 MÅL FOR OPPGAVEN .....	4
<b>1. INNLEDNING .....</b>	<b>5</b>
1.1 SYMPTOMER OG FUNN .....	5
1.2 DIAGNOSTIKK .....	6
1.3 BEHANDLING OG OPPFØLGING .....	7
1.4 KOMPLIKASJONER OG PROGNOSE .....	8
1.5 ETIOLOGI .....	9
1.6 DISPONERENDE MILJØFAKTORER .....	10
1.7 GENETIKK OG GENSTUDIETYPEN .....	11
<b>2. METODER.....</b>	<b>14</b>
<b>3. RESULTATER .....</b>	<b>15</b>
<b>4. DISKUSJON .....</b>	<b>19</b>
KONKLUSJON .....	21
<b>LITTERATURHENVISNINGER .....</b>	<b>22</b>

## Abstract

Celiac disease is a chronic inflammatory disease induced by ingested gluten from wheat, and similar proteins from barley and rye. An inappropriate immune response to gluten peptides leads to lymphocyte infiltration, villous atrophy and crypt hyperplasia in the small intestine. This gives symptoms as diarrhea, stomach pain and signs of malabsorption. The only, but very effective, treatment is gluten-free diet. The etiology is complex and not fully understood, but CD4<sup>+</sup> T-helper cells and their recognition of gluten peptides on HLA-molecules is thought to play an important role. The only known genetic risk factor up until recently has been the HLA genes. There has been an intense hunt for more genes predisposing to celiac disease. But neither linkage studies nor traditional association studies have given clear answers. The introduction of genome-wide association studies (GWAS) have however started a new era in the investigation of complex diseases' genetics, including celiac disease. Genome-wide association studies on celiac disease have so far found 11 new gene regions to have significant association with celiac disease. Almost all the new regions harbor genes with immunological functions. The strongest association has been shown for a region harboring IL2 and IL21, which both are good candidate genes. There has also been found that some genes are shared between immunological diseases, implying that there are common risk variants for these diseases. Further investigation with new genome-wide association studies and fine mapping and deep resequencing of the new gene regions will hopefully clear up the somewhat blurry picture we have of the etiology of celiac disease today. And with better understanding of the disease, often comes better diagnostic tools and treatment. One thing is for sure; scientists investigating celiac disease and other chronic inflammatory diseases have some interesting years ahead!

## 0.1 Mål for oppgaven

Jeg ønsker i denne oppgaven å gi et innblikk i de siste års resultater i jakten på gener som disponerer for cøliaki. Jeg valgte denne sykdommen fordi cøliaki er på mange måter en modellsykdom for immunologiske sykdommer med komplisert genetikk. Samtidig er cøliaki i en særposisjon da man har en helt klar utløsende miljøfaktor, nemlig gluten.

# 1. Innledning

Cøliaki er en kronisk inflammatorisk tarmsykdom som utløses av inntak av hvete, bygg eller rug. Gluten og lignende proteiner i disse kornsortene gir inflammasjon i tynntarm som resulterer i avflating av tarmslimhinnen<sup>1</sup>. Dette kan føre til blant annet diaré, magesmerter og malabsorpsjon. Glutenfri kost er hittil det eneste behandlingsalternativet. Dette er en krevende, men effektiv behandling. Cøliaki ble tidligere sett på som en sjelden sykdom. Men de senere tiår har prevalensen økt betraktelig<sup>2</sup>. Dette kan settes i forbindelse med bedre diagnostiske verktøy og ny kunnskap om cøliakis ulike presentasjonsformer. Prevalensen anslås til å ligge rundt 0,5 % på verdensbasis<sup>2</sup>. Etiologien ved cøliaki er, som ved de fleste kroniske inflammatoriske sykdommer, multifaktoriell og komplisert. Men man vet at det er en stor grad av arvelighet (inkludert HLA) og at i alle fall en miljøfaktor (gluten) er helt nødvendig.

## 1.1 Symptomer og funn

Det klassiske bildet av cøliaki er en sykdom som debuterer i barnealder med kronisk fettholdig diaré, underernæring, oppblåst mage, magesmerter og tegn på mangelsykdommer(jern, folat og vitamin A og D)<sup>3</sup>.

De siste tiår har man imidlertid blitt klar over at cøliaki har mange ulike presentasjonsformer, og at ”klassisk cøliaki” ikke nødvendigvis er det vanligste. Sykdommen kan like gjerne oppstå i voksen alder, og symptomene er da gjerne mindre typiske enn hos barn. Det er også noen som ikke har symptomer i det hele tatt<sup>2</sup>.

Atypiske symptomer som kan være et uttrykk for cøliaki er blant annet nevrologiske symptomer som epilepsi, migrene, ataksi og polyneuropati, uklare allmennsymptomer, symptomer som ved irritabel tarm, leddplager, forsinket pubertet, irritabilitet og vekstretardasjon hos barn<sup>2,4</sup>.

## 1.2 Diagnostikk

ESPGHAN (European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) har laget kriterier for cøliakidiagnostikk<sup>5</sup>. De er i utgangspunktet laget for barn, men brukes også hos voksne:

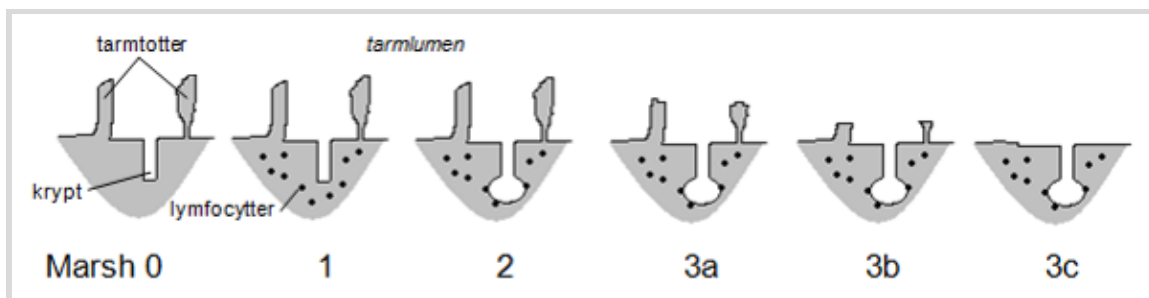
- a) Kliniske funn forenlig med cøliaki.
- b) Tynntarmsbiopsi viser totteatrofi.
- c) God og rask effekt av glutenfri kost, med serokonversjon.
- d) Ved tvil om diagnosen, eller hvis pasienten er under to år, kan diagnosen sikres med glutenprovokasjonstest.

Det er vanlig å starte diagnostikken med serologi. Cøliakere danner vanligvis antistoffer mot både gluten og transglutaminase(TG2)<sup>4</sup>. Slimhinneaffeksjonen ved cøliaki gjør antistoffer av typen IgA til et naturlig valg for undersøkelse. Den sikreste testen er IgA-TG2, som har en sensitivitet på rundt 90 % og spesifisitet på nær 100 % ved cøliakisymptomer<sup>4</sup>. Om denne testen er positiv utføres tynntarmsbiopsi. Men siden sensitiviteten er bare 90 % bør biopsi tas ved sterk klinisk mistanke, selv om IgA-TG2 er negativ.

Biopsi regnes som fasitsvaret i cøliakidiagnostikk. Biopsi tas med endoskopi fra duodenum, og de klassiske funnene er totteatrofi, krypthypertrofi og lymfocytinfiltrasjon<sup>4</sup>. Patologene bruker Marshs klassifikasjonssystem for å beskrive biopsifunnene, se tabell 1 og figur 1.

Marsh klasse	Totter	Krypter	Lymfocytter
Marsh 0	normale	normale	normale
Marsh 1	normale	normale	økt antall
Marsh 2	normale	hyperplasi	økt antall
Marsh 3a	partiell atrofi	hyperplasi	økt antall
Marsh 3b	subtotal atrofi	hyperplasi	økt antall
Marsh 3c	total atrofi	hyperplasi	økt antall
Marsh 4	Irreversibel atrofisk slimhinne		

**Tabell 1** Marshs klassifikasjon av tynntarmsbiopsier ved cøliaki<sup>4</sup>



**Figur 1** Skjematisk oversikt over forandringer i tarmmucosa ved cøliaki

Ved Marsh  $>2$  kan diagnosen stilles, og behandling startes. Ved positiv serologi, men biopsi uten totteatrofi oppfyller man i utgangspunktet ikke kriteriene for en cøliakidiagnose. Men disse pasientene har ofte god effekt av glutenfri diett, og tendensen går mot å behandle også disse. Det kan tenkes at de er i ferd med å utvikle cøliaki<sup>4</sup>.

Hvis man er i tvil om diagnosen kan det utføres immunhistokjemisk undersøkelse av biopsien<sup>4</sup>. Man undersøker da for ulike typer T-cellereseptorer, som opptrer i et annet mønster hos cøliakere enn hos friske.

Man kan også utføre HLA-typing. Så å si alle cøliakere har enten HLA-DQ2 eller HLA-DQ8<sup>6</sup>, så hvis pasienten ikke har noen av disse HLA-variantene kan vi med stor sikkerhet utelukke cøliaki. Men HLA-DQ2 og HLA-DQ8 er ganske vanlig også hos friske, og et positivt resultat gir dermed lite informasjon. HLA-typing er altså en test for å utelukke cøliaki.

### 1.3 Behandling og oppfølging

Livslang glutenfri diett er fortsatt det eneste behandlingsalternativet ved cøliaki. Dette er til gjengjeld en effektiv behandling som i de fleste tilfeller gir komplett tilbakegang av symptomer og funn. I tillegg forebygger glutenfri diett komplikasjoner på lengre sikt, og godt behandlede cøliakere har verken økt morbiditet eller mortalitet i forhold til friske<sup>7</sup>. Klinisk bedring kan oppnås i løpet av uker, mens histologisk bedring og serokonversjon inntreffer i løpet av et år på diett.

Etter et år på glutenfri diett er altså pasientene som regel symptomfrie, har normal tynntarmshistologi og TG2-antistoffer er ikke lenger påvisbare. Dette gjør det svært viktig at glutenfri diett ikke startes før cøliakidiagnostikken er fullført.

De fleste cøliakere tåler en liten mengde gluten<sup>7</sup>. Ved å tillate dette, for eksempel i form av hvetestivelse, kan man øke livskvaliteten betraktelig uten å nødvendigvis øke

risikoen for komplikasjoner. Men dette er en vanskelig balansegang, da det varierer kraftig fra pasient til pasient hvor mye gluten som tolereres.

Bygg og rug har proteiner som ligner gluten og kan ikke inntas av cøliakere. Alternative kornslag som mais, ris, bokhvete og hirse tolereres, og havre tillates for voksne pasienter<sup>7</sup>.

Noen har også behov for laktosefri kost de første månedene etter at diagnosen er stilt. Dette er ingen allergisk reaksjon. Årsaken er at laktose(melkesukker) vanligvis spaltes av laktase som er et enzym festet i slimhinnen av tarmtottene. Mye av dette enzymet forsvinner ved totteatrofi, men det kommer tilbake ved normalisering av slimhinnen.

Tilskudd av jern, folat og fettløselige vitaminer bør overveies den første tiden.

Når selv ikke naturlig glutenfri diett gir tilstrekkelig symptomlindring har pasienten det som kalles behandlingsrefraktær cøliaki<sup>4</sup>. Dette kan være en relativt benign tilstand, men det finnes også mer maligne former. Ved manglende behandlingseffekt er det viktig å utelukke andre årsaker til symptomene.

## 1.4 Komplikasjoner og prognose

Som nevnt ses verken økt sykkelighet eller dødelighet hos cøliakere som følger glutenfri diett<sup>7</sup>. Men dersom diagnosen ikke er oppdaget, eller dietten ikke etterleves øker faren for komplikasjoner.

Komplikasjoner som ses ved ubehandlet cøliaki er blant annet osteoporose, kreft i magetarmkanalen (særlig non-Hodgkin lymfom), økt hyppighet av spontanaborter, mangelsykdommer og nevrologiske symptomer<sup>4</sup>.

Andre sykdommer med en autoimmun komponent sees hyppigere hos cøliakere enn hos resten av befolkningen<sup>8</sup>. Dette gjelder blant annet diabetes mellitus type 1 og reumatoid artritt. Årsaken til dette er sannsynligvis felles disponerende faktorer.

Dermatitis herpetiformis er en hudsykdom som er nært beslektet med cøliaki. 10 % av cøliakere har denne sykdommen, mens den er så å si fraværende i resten av befolkningen<sup>3</sup>. Et kløende papulovesikulært utslett forekommer på ekstensorsiden av ekstremitetene, buken, skallen og nakken. De aller fleste pasientene med dermatitis herpetiformis har betennelsesforandringer i tynntarmsslimhinnen og glutenfri diett gir tilbakegang av utslettet.



## 1.5 Etiologi

Det er fortsatt mye som er uklart rundt cøliakis etiologi, men en del elementer er kjent<sup>9</sup>. Se figur 2 på neste side.

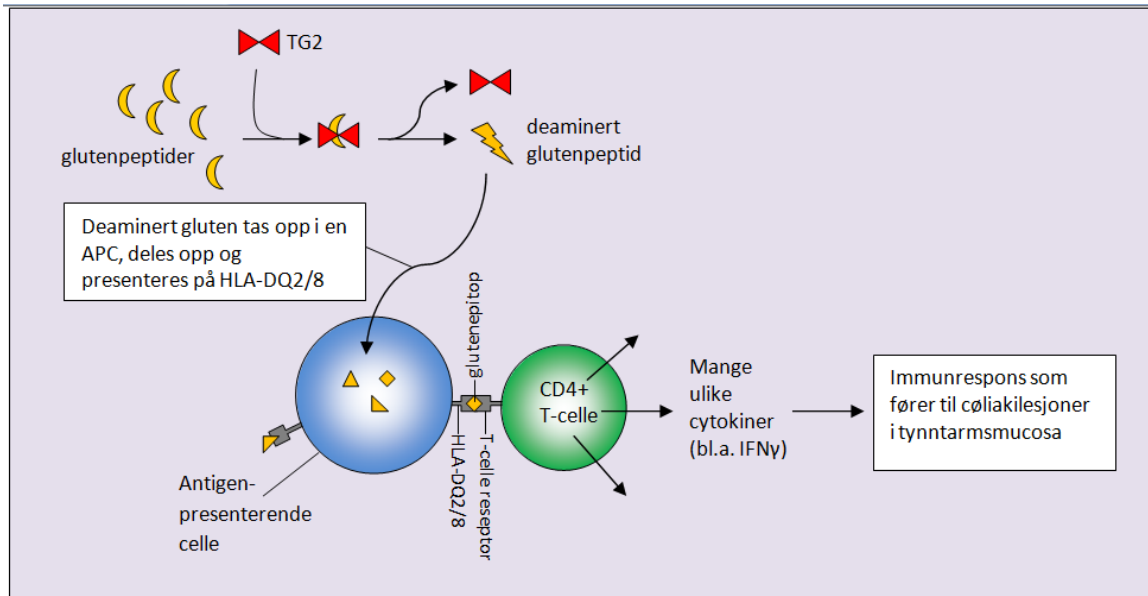
La oss starte med gluten, som er det utløsende agens. Gluten er bygget opp av blant annet gliadiner. Det finnes mange hundre ulike gliadiner, men felles for dem er at de har et høyt prolininnhold. Disse danner bindinger som vår fordøyelse ikke kan bryte, slik at gluten ikke blir fullstendig fordøyd. Men før glutenpeptidene kan gjenkjennes av immunforsvaret må de deamineres. Det er enzymet vevstransglutaminase(TG2) som sørger for å gjøre dette<sup>1</sup>.

Disse deaminerte glutenpeptidene tas opp i antigenpresenterende celler. De bearbeides og presenteres så på HLA(MHC) klasse II molekyler<sup>9</sup>. Det er kun HLA-DQ2 og HLA-DQ8 som kan presentere disse peptidene. Forenklet kan man si at det er kun disse to HLA-variantene som har bindingsgroper som passer til glutenpeptidene. Dette forklarer hvorfor HLA-DQ2 eller DQ8 er helt nødvendig for å utvikle cøliaki.

Ved aktiv cøliaki sees en sterk økning i antall CD4-positive T-hjelperceller i mucosa i duodenum og proksimale jejunum<sup>1</sup>. Disse T-cellene gjenkjenner gluten-peptid som presenteres på HLA-molekyler, og setter i gang en immunreaksjon ved å skille ut mange ulike cytokiner. Man tror at disse T-cellene spiller en helt sentral rolle og orkestrerer mange av immunreaksjonene som ses ved cøliaki. De skiller ut store mengder IFN- $\gamma$ , som derfor antas å ha en sentral betydning i sykdomsutviklingen<sup>1</sup>.

Det har lenge vært et mysterium hvordan en allergisk reaksjon mot eksogent gluten kan føre til dannelse av autoantistoffer mot kroppens egne TG2, og ikke minst hvordan produksjonen av disse autoantistoffene reguleres av gluten. En mulig forklaring på dette kan være at transglutaminase og gluten danner kompleks i deamineringsprosessen, og at dette komplekset tas opp i TG2-spesifikke B-celler. B-cellene presenterer så glutenpeptider på HLA-molekylene. Glutenspesifikke T-hjelperceller gjenkjenner glutenpeptidene og aktiverer B-cellene som begynner å produsere TG2-antistoffer. Om man fjerner gluten vil bare TG2 tas opp, og dette vil ikke gjenkjennes av T-cellene og antistoffproduksjonen stopper opp<sup>1</sup>. Det må presiseres at dette kun er en teori, som tar til gode å bevises.

Når vi har autoantistoffer mot TG2 er det lett å tenke at disse sikkert er involvert i dannelsen av cøliakilesjoner i tarmen. Det er imidlertid ingen forskningsresultater som kan bekrefte dette ennå. Det har også vært vurdert om TG2-antistoffene kan bidra til ekstraintestinale manifestasjoner ved cøliaki<sup>1</sup>. Men dette er fortsatt kun spekulasjoner.



**Figur 2** Oversikt over cøliakis etiologi.

## 1.6 Disponerende miljøfaktorer

Man har sett at barn som er født om sommeren har høyere forekomst av cøliaki<sup>10</sup>. Dette kan skyldes at de introduseres for gluten om vinteren, når infeksjoner er hyppigere. Man vet fra andre autoimmune sykdommer at infeksjon kan være en utløsende faktor.

Det ser ut til at pågående brysternæring, særlig i forbindelse glutenintroduksjon, kan ha en beskyttende effekt<sup>11</sup>. Det anbefales å introdusere gluten hos spedbarn i 4-6 måneders alder.

Som nevnt ses andre sykdommer med en autoimmun komponent hyppigere hos cøliakere, og cøliaki ses hyppigere hos pasienter med en annen autoimmun sykdom. Dette skyldes sannsynligvis i stor grad felles genetiske faktorer, men felles disponerende miljøfaktorer kan heller ikke utelukkes.

## 1.7 Genetikk og genstudietyper

### *Genetikk*

Tvilling- og familiestudier har vist at gener spiller en stor rolle for utviklingen av cøliaki. Hvis en enegget tvilling har cøliaki, er risikoen for at også den andre tvillingen utvikler cøliaki 85 %. For toeggede tvillinger er denne risikoen 20 %.<sup>12</sup>

For inntil få år siden var HLA-genregionen den eneste veldokumenterte genetiske disposisjonen for cøliaki<sup>6</sup>. HLA-DQ2 eller DQ8 er helt nødvendig for å utvikle cøliaki, men ikke tilstrekkelig. Og HLA-regionen anslås å forklare under 40 % av cøliakis arvelighet<sup>13</sup>, så det må være flere disponerende gener der ute.

### *Genstudier*

I hovedsak er det to strategier som er benyttet i jakten på gener som disponerer for cøliaki<sup>14</sup>. Det er koblingsstudier og assosiasjonsstudier. Begge har sine fordeler og ulemper, og det finnes flere varianter av hver.

Ved koblingsstudier tar man utgangspunkt i familier med cøliaki, og studerer slektninger med sykdommen. Man ser da etter genområder som cøliakere nedarver i større grad enn forventet, og sier at disse områdene er koblet til sykdommen. Fordelen med koblingsstudier er at man kan koble sykdom til et kromosomområde, uten å vite noe om kandidatgenene på forhånd. Noe av problemet med koblingsstudier er at det er vanskelig å skille gener som vanligvis nedarves sammen som en haplotype. Et slikt koblet genområde blir derfor ganske stort og kan inneholde opptil flere hundre gener.<sup>15</sup>

Ved sykdommer som skyldes kun én genfeil har koblingsstudier vært effektive, men ved mer komplekse sykdommer som cøliaki har de ikke kommet opp med overbevisende resultater, og ingen av resultatene har blitt tilfredsstillende reproduisert. Koblingsstudier som har vært gjort for cøliaki har hatt en størrelse som gjør at de kun er i stand til å oppdage vanlige genvarianter med stor effekt på sykdomsutviklingen, som HLA-DQ2/8.<sup>16</sup>

Ved assosiasjonsstudier undersøker man forekomsten av gitte gener hos syke sammenlignet med resten av befolkningen<sup>15</sup>. Single nucleotid polymorphisms, SNPer, brukes som markører for genet. Kandidatgener som skal undersøkes for assosiasjon kan man velge ut på flere måter: man kan velge ut en SNP fra et koblingsområde funnet ved en koblingsstudie, eller man kan velge en SNP som ligger nær et gen som antas å ha betydning for patogenesen til sykdommen. Ved assosiasjonsstudier ender

man opp med et mye mindre genområde enn ved koblingsstudier. Dette er fordi det er mye smalere områder som vanligvis opptrer sammen i befolkningen, enn hva som vanligvis nedarves sammen i en familie. Et område som viser assosiasjon inneholder gjerne ett eller noen få kandidatgener.<sup>15</sup>

Noen feilkilder er det ved assosiasjonsstudier<sup>16</sup>. For det første er det usannsynlig at SNPer man har undersøkt faktisk er SNPer som forårsaker assosiasjonen. Den undersøkte SNPer representerer et område med koblingsulikevekt (linkage disequilibrium, LD), og man kan ikke si sikkert hvilke av genene i dette området som er årsaksgenet. For å avdekke årsaksgenet må man bruke andre metoder, som sekvensering av DNA.

Et annet problem med assosiasjonsstudier er at man kan få falskt positive resultater på grunn av befolkningsstratifisering. Dette går ut på at man har deler av befolkningen som ikke blandes med resten, på bakgrunn av for eksempel sosial status eller religion. Hvis denne gruppen har økt forekomst av cøliaki, vil alle genvarianter de tilfeldigvis også har overhyppighet av virke assosiert med sykdommen. Stratifikasjon kan minimeres ved streng seleksjon av kontrollgruppen, eller ved å bruke mer avanserte familiebaserte metoder for assosiasjonsundersøkelse<sup>15</sup>.

Tradisjonelle assosiasjonsstudier har heller ikke gitt overbevisende resultater ved cøliaki. En årsak til dette kan være at jakten på kandidatgener blir som et skudd i mørke. Et problem kan også være ulik betydning av kandidatgener hos ulike befolkninger.

Det har også vært forsøkt andre metoder i jakten på cøliakigener, som kombinert undersøkelse av genekspressjon i biopsier og genetisk assosiasjon for kandidatgener<sup>17</sup>. Dette gjør det mulig å fange opp strukturelle DNA-varianter, som ikke oppdages ved undersøkelse av SNPer. Forsøk på reproduksjon av resultatene fra denne studien har dessverre vært mislykkede.

Det store gjennombruddet kom først med introduksjonen av fullgenoms assosiasjonsstudier (Genome-wide association studies, GWAS, senere omtalt som gwas)<sup>18</sup>, som er studietypen denne oppgaven vil fokusere på.

Gwas er en type assosiasjonsstudie uten kandidatgener. Isteden testes hele genomet for flere hundre tusen SNPer, og man ser etter assosiasjon for hver enkelt SNP. Man kan også se på dette som en assosiasjonsstudie med svært mange kandidatgener. Med så mange hypoteser om assosiasjon, må det kreves en svært lav p-verdi for å unngå falskt positive svar.  $p < 5 \times 10^{-7}$  er grenseverdien som vanligvis brukes for å fastslå

signifikant assosiasjon ved gwaser<sup>19</sup>. Ellers deler denne studietypen egenskapene til tradisjonelle assosiasjonsstudier.

Om man går videre med tankegangen om at tradisjonelle assosiasjonsstudier er som et skudd i mørket, er gwaser i det minste et hageskudd. Med andre ord er sannsynligheten for å treffe et eller annet betraktelig økt.

## 2. Metoder

Jeg har valgt å legge fokus på fullgenoms assosiasjonsstudier ved cøliaki. Jeg søkte på "celiac disease AND genome-wide association study" i PubMed. Dette ga 28 treff, og jeg valgte ut fullgenoms assosiasjonsstudier og oppfølgings- og replikasjonsstudier. Jeg endte opp med 8 artikler.

I tillegg valgte jeg ut 3 artikler som ser etter felles kandidatgener med diabetes mellitus og reumatoid artritt. Dette er tenkt som et lite tillegg, og ikke som en fullstendig oversikt.

### 3. Resultater

Den første fullgenoms assosiasjonsstudien for cøliaki ble publisert i 2007<sup>20</sup>. *van Heel DA et al* testet 310 605 SNPer for assosiasjon hos 778 britiske cøliakere og 1 422 kontroller. I tillegg til den ventede assosiasjonen til HLA-regionen, fant de en region på kromosom 4q27 som viste signifikant assosiasjon med cøliaki,  $p=2 \times 10^{-7}$ . I denne regionen er det et område med koblingsulikevekt(LD) som inneholder 3 kjente gener: TENR, IL2 og IL21. Det antas også å være et fjerde gen med ukjent funksjon: KIAA1109. TENR viste spesifikk ekspresjon i testis, og ikke målbar ekspresjon i duodenum, og er dermed et usannsynlig kandidatgen. IL2 sekreses fra antigenstimulerte T-celler og er viktig i T-celleaktivering og -proliferasjon. IL21 bidrar til B-, T- og NK-celleproliferasjon og IFN $\gamma$ -produksjon. De replikerte funnene hos 508 nederlandske og 483 irske cøliakere og henholdsvis 929 og 560 kontroller. Metaanalyse med disse tre populasjonene ga en ennå mer overbevisende p-verdi, med  $p=4,8 \times 10^{-11}$ .

I 2008 publiserte *Hunt KA et al.* en oppfølgingsartikkel<sup>21</sup> der de genotypet de 1 020 SNPene som viste sterkest assosiasjon i den første artikkelen<sup>20</sup> hos 1 643 britiske cøliakere og 3 406 kontroller. De la sammen resultatene fra begge artiklene og lagde en metaanalyse. I tillegg til HLA-regionen og IL2/IL21 fant de 7 nye regioner med signifikant assosiasjon til cøliaki, dvs.  $p < 5 \times 10^{-7}$ . Regionene som ble funnet å være assosiert med cøliaki ligger på kromosom 1q31, 2q11-12, 3p21, 3q25-26, 3q28, 4q27, 6q25 og 12q24.

Av de nye regionene ble den sterkeste assosiasjonen funnet på kromosom 1q31, med  $p=2,58 \times 10^{-11}$  og OR=0,71. Dette området inneholder genet RGS1, som koder for et protein involvert i g-protein signaliering, og som skal være involvert i B-celleaktivering og -proliferasjon. Dette genet har ekspresjon i tynntarmsbiopsier, og spesielt i områder med epitelcelledød og totteatrofi.

2q11-12 inneholder flere cytokinreseptorgener, blant annet IL18RAP som er en del av IL18-reseptoren. Dette er et sterkt kandidatgen da det påvirker T-celler til å skille ut IFN $\gamma$ . Modent IL18 uttrykkes i tarmmucosa hos cøliakere, men ikke hos friske.

IL18RAP uttrykkes i ustimulerte T-celler, NK-celler og i tynntarmsbiopsier.

3p21 har en stor samling chemokinreseptorgener, inkludert CCR1,2,3, og 5. Dårlig HapMap-dekning i området gjør det vanskelig å velge ut gener.

På kromosom 3q25-26 finner vi IL12A, en del av IL12 som har et vidt spekter av virkninger på T- og NK-celler. IL12 stimulerer blant annet IFN $\gamma$ -produserende T-celler.

3q28 er den eneste regionen uten noen kjente gener med immunologisk funksjon. Her finnes i midlertid LPP-genet som uttrykkes i stor grad i tynntarm. Funksjonen til dette genet er noe uklar, men det kan ha en rolle i cellebevegelse, -fasong og adhesjon.

4q27 inneholder som nevnt blant annet IL2 og IL21, og har vist signifikant assosiasjon tidligere. Assosiasjonen ble reprodusert i denne artikkelen, med  $p=2,82 \times 10^{-13}$ .

På kromosom 6q25 finner man TAGAP som uttrykkes i aktiverte T-celler og som modulerer cytoskjelettendringer.

12q24 inneholder SH2B3 og ATXN2. SH2B3 uttrykkes i monocytt og dendritiske celler. SH2B3 regulerer blant annet leukocythomeostase gjennom flere ulike reseptorer. SH2B3 knockout mus har vist økt respons på mange cytokiner.

Den samme gruppen publiserte i 2009 nok en oppfølgingsartikkel, signert *Trynka G et al*<sup>22</sup>. De valgte her å fokusere på genområder som viste moderat assosiasjon i originalartikkelen<sup>20</sup>. De testet 458 SNPer for assosiasjon hos 1682 cøliakere og 3258 kontroller fra Storbritannia, Irland og Nederland, og kombinerte dette med resultatene fra originalartikkelen til en metaanalyse. De fant 6 SNPer som viste p-verdi  $<1 \times 10^{-4}$ , og som ble genotypet i en uavhengig Italiensk kohorte. De endte opp med 2 genområder som viste signifikant assosiasjon. Det ene området ligger på kromosom 6q23 og inneholder genene OLIG3 og TNFAIP3. Dette området ga en p-verdi på  $1,3 \times 10^{-8}$ . TNFAIP3s genprodukt er nødvendig for å avslutte NF- $\kappa$ B signaler, som er en del av det medfødte immunsystem. Knockout mus har vist vedvarende aktivering av NF- $\kappa$ B av toll-like reseptorer, med følgende multiorganinflammasjon. Det andre området ligger på kromosom 2p16 og inneholder kandidatgenet REL som også påvirker NF- $\kappa$ B signaler.

*Adamovic et al* ville reprodusere assosiasjonen til IL2/IL21 på 4q27 i norske og svenske familier<sup>23</sup>. De brukte transmission disequilibrium test som er en familiebasert assosiasjonsstudiedesign, som fjerner problemet med befolkningsstratifisering. De bekreftet signifikant assosiasjon til IL2/IL21. De forsøkte også å finne assosiasjon til FcγRIIa, som har vist assosiasjon til type 1 diabetes og reumatoid artritt, uten suksess.

Den samme gruppen publiserte i 2009 en ny artikkel<sup>24</sup>, nå signert *Amundsen SS et al*, der de ville reprodusere *Hunt KA et al*<sup>21</sup> resultater i de samme norske og svenske familiene og med samme studiedesign som forrige artikkel<sup>23</sup>. De fant signifikant assosiasjon til RGS1 på 1q31, CCR på 3p21, IL12A på 3q25-26 og LPP på 3q28. Moderat, men ikke-signifikant, assosiasjon ble funnet for IL18RAP. Ingen assosiasjon ble funnet for TAGAP. SH2B3 ble ikke analysert grunnet tekniske problemer. De forsøkte videre å finne årsaksgenet i CCR1,2,3-området, uten å lykkes.



*Romanos J et al* ønsket å reprodusere van *Heel et al*<sup>20</sup> og *Hunt et al*<sup>21</sup> resultater i den italienske befolkning<sup>25</sup>. De testet for assosiasjon til de 8 områdene hos 538 cøliakere og 593 kontroller. De fant signifikant assosiasjon til genområdene som inneholder IL2/IL21, RGS1, IL12A og SH2B3. Moderat, men ikke signifikant, assosiasjon ble funnet for LPP og TAGAP. Og de fant ingen assosiasjon til CCR3 og IL18RAP.

*Koskinen LL et al* forsøkte å reprodusere assosiasjonen til genområdet på kromosom 2q11-12 som inneholder IL18RAP hos 1638 cøliakere og 1385 kontroller i den finske, ungarske og italienske befolkning<sup>26</sup>. Assosiasjonen ble bekreftet i den ungarske befolkningen, men ikke i den finske og italienske.

*Garner CP et al* undersøkte de samme 1020 SNPene som *Hunt et al*<sup>21</sup> hos 906 amerikanske cøliakere og 3819 kontroller<sup>27</sup>. Etter kvalitetskontroll ble til slutt 975 SNPer analysert for assosiasjon. 11 SNPer hadde  $p < 10^{-11}$ . Man fant sterk assosiasjon for 1q31(CCR), 3q25(IL12A), 3q28(LPP), 4q27(IL2/IL21) og 12q24(SH2B3). De fant i tillegg assosiasjon til et nytt område på 2q31 som inneholder kandidatgenet integrin alfa-4, ITGA4. Integriner er involvert i aktivisering av immunceller, i tillegg til adhesjon og migrasjon. Alfa-4 integriner uttrykkes på lymfocytter og monocytter. En underenhet binder seg til VCAM1 som er oppregulert i endotel ved kronisk inflammasjon, og som tidligere har vært angitt som kandidatgen for cøliaki. TG2 interagerer også med ITGA4.

Her er studiene som forsøker å finne genområder som deles med andre immunologiske sykdommer:

*Zhernakova A et al* ser på assosiasjon i IL2/IL21-området på kromosom 4q27 til reumatoid artritt og diabetes type 1<sup>28</sup>. De testet 350 T1D-pasienter, 1047 RA-pasienter og 929 kontroller for assosiasjon. De fant signifikant assosiasjon mellom genområdet og både diabetes type 1 og reumatoid artritt.

*Smyth DJ et al* undersøkte SNPer som er funnet å ha assosiasjon til cøliaki hos diabetes type 1 pasienter, og vice versa<sup>29</sup>. De testet 18 genområder assosiert med diabetes for assosiasjon hos 2560 cøliakere og 9339 kontroller. I tillegg testet de 8064 T1D-pasienter, 9339 kontroller og 2828 T1D-familier for assosiasjon med de 8 genområdene *Hunt et al*<sup>21</sup> fant å være assosiert med cøliaki. Området på kromosom 3p21 med CCR-gener og på 12q24 med SH2B3 var allerede funnet å være assosiert med begge sykdommene i andre studier. I tillegg fant forfatterne at diabetes-genene PTPN2 på kromosom 18p11 og CTLA-4 på kromosom 2q33 er assosiert med cøliaki. Cøliakigenene RGS1, IL18RAP og TAGAP viste assosiasjon til T1D, men det er interessant å merke seg at IL18RAP og TAGAP har motsatt rettet effekt på risikoen for de to sykdommene.

*Coenen MJ et al* sammenlignet på lignende måte kandidatgener ved cøliaki med kandidatgener ved reumatoid artritt<sup>30</sup>. De undersøkte 11 SNPer assosiert med reumatoid artritt og 11 SNPer assosiert med cøliaki hos 1368 RA-pasienter, 795 cøliakere og 1683 kontroller. De kombinerte resultatene med resultater fra tidligere gwaser . I metaanalysen fant de felles assosiasjon i 6 loci: TNFAIP3, IL2/IL21, SH2B3, LPP, MMEL1/TNFRSF14 og PFKFB3/PRKCQ. To av disse var kjent på forhånd og 4 nye ble oppdaget.

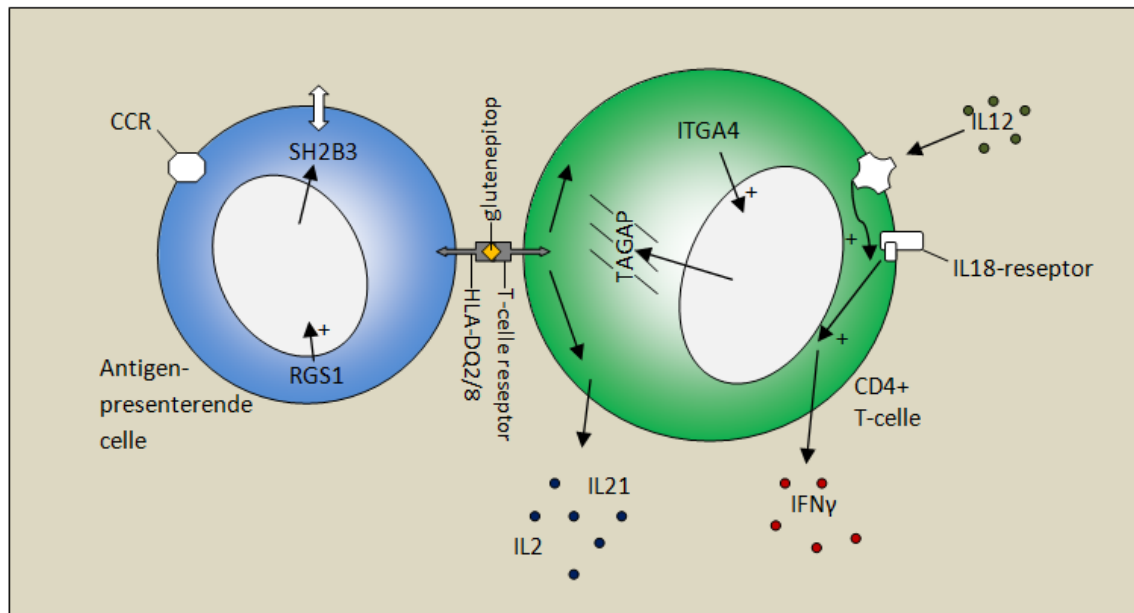
## 4. Diskusjon

Introduksjonen av gwas i jakten på cøliakigener må sies å være en svært vellykket bedrift. Det er funnet 11 nye assosiasjoner med svært lave p-verdier, og de fleste funnene har latt seg reproducere. Se Tabell 2.

Kromosom	Kandidatgen	Funksjon	OR	p-verdi	Studie	Andre ass.
4q27	IL2, IL21	T-celle proliferasjon	0,66	$2,8 \times 10^{-13}$	20,21,23,25,27	T1D, RA
1q31	RGS1	B-celle proliferasjon	0,71	$2,6 \times 10^{-11}$	21,24, 25	T1D
2q11-12	IL18RAP	IFN $\gamma$ -sekresjon	1,27	$8,5 \times 10^{-10}$	21,26	
3p21	CCR	Chemokinreseptorer	1,21	$3,1 \times 10^{-7}$	21,24,27	T1D
3q25-26	IL12A	IFN $\gamma$ -sekresjon	1,34	$1,1 \times 10^{-9}$	21, 24, 25, 27	
3q28	LPP	Celleadhesjon	1,21	$5,3 \times 10^{-9}$	21,24,27	RA
6q25	TAGAP	Cytoskjelett	1,21	$6,7 \times 10^{-8}$	21	
12q24	SH2B3	Cellehomeostase	1,19	$8,0 \times 10^{-8}$	21,25,27	T1D, RA
6q23	OLIG3, TNFAIP3	NF- $\kappa$ B signal	1,25	$1,3 \times 10^{-8}$	22	RA
2p16	REL	NF- $\kappa$ B signal	0,84	$5,2 \times 10^{-7}$	22	
2q31	ITGA4	celleaktivering	-	$1,3 \times 10^{-5}$	27	

**Tabell 2:** Genområder som er funnet å være assosiert med cøliaki ved gwas. "Funksjon" viser en faktor kandidatgenet påvirker. "Studie" refererer til artikkel i Litteraturhenvvisninger som har vist signifikant assosiasjon. T1D = diabetes type 1, RA = reumatoid artritt.

Av områdene som viser assosiasjon til cøliaki er det bare ett område som ikke inneholder gener med immunologiske funksjoner. Se Tabell 2 og Figur 3. Dette underbygger den allerede vel etablerte tanken om at cøliaki først og fremst er en immunologisk sykdom. Andre endringer som strukturelle eller funksjonelle endringer i tarmmucosa kan antas å ha liten eller ingen betydning.



**Figur 3** Oversikt over noen av funksjonene til de nye kandidatgenene inspirert av ref 16.

Det er også funnet genområder som er assosiert til både cøliaki og andre immunologiske sykdommer. Dette gjør at vi kan snakke om gener som disponerer for immunologiske sykdommer generelt.

Hver av de nye genområdene gir kun et lite bidrag til cøliakis arvelighet, og det er anslått at over halvparten av arveligheten ved cøliaki fortsatt er uoppdaget<sup>16</sup>. Flere faktorer kan bidra til dette:

En sannsynlig årsak er at det er svært mange gener som bidrar med en liten disposisjon hver. Løsningen er da å utføre flere gwaser, med påfølgende metaanalyser, for å finne flere assosierte gener.

En annen forklaring kan være at det finnes sjeldne genvarianter som har stor betydning for sykdomsutviklingen i noen familier, men som ikke er vanlige nok til å oppdages. For å oppdage slike sjeldne varianter må DNA sekvenseres i slike familier, med dette er et svært omfattende arbeid.

En tredje forklaring er at endel av arveligheten ligger i strukturelle DNA-varianter, som ikke oppdages ved testing av SNPer. Copy-number-variations er en viktig form for strukturelle DNA-varianter. Nye metoder som gjør at CNVer kan testes på lignende måte som SNPer testes i dag er under utvikling.

Når årsaksgener oppdages kan det forventes høyere OR, fordi man kan teste direkte på SNPen som forårsaker assosiasjonen. Med høyere OR vil også en større del av arveligheten være forklart. Årsaksgener kan oppdages ved sekvensering av områder som har vist signifikant assosiasjon.

Man kan heller ikke utelukke at genene påvirker hverandre, såkalt epistaksis. Det kan bety at en genetisk variant kun gir disposisjon for sykdom dersom en spesiell genetisk variant et annet sted også er tilstede. Dette fenomenet kompliserer genetikken kraftig. Hemmeligheten bak å finne resten av cøliakis arvelighet ligger sannsynligvis i en kombinasjon av disse faktorene. Så mange ulike våpen må brukes i den videre jakten på kandidatgener.

### *Hva med framtiden?*

Og selv om det er oppdaget en del nye kandidatgener er det fortsatt en lang vei før vi kan begynne å snakke om nye behandlingsmuligheter for cøliaki. Men den nye kunnskapen gir en økt innsikt i sykdomsmekanismene, og man kan ikke se bort i fra at dette på sikt kan gi nye angrepspunkter for behandling.

Det er heller ikke usannsynlig at det kan komme diagnostisk utstyr som kan måle mange hundre genetiske markører samtidig, og dermed gi et mye mer nøyaktig mål for risiko enn det man kan gi i dag. Dette kan for eksempel brukes for å teste barn av cøliakere. Og om man finne høy risiko hos et barn kanskje man kan intervenere i forbindelse med glutenintroduksjon. For eksempel å ikke introdusere gluten i forbindelse med infeksjon?

Cøliaki har stor individuell variasjon i presentasjon og alvorlighet. Det kan derfor tenkes at forskjellige gener disponerer for forskjellige presentasjonsformer. Og at cøliakere derfor på sikt kanskje kan inndeles i undergrupper av cøliaki, basert på genetikk.

## Konklusjon

Fullgenomsassosiasjonsstudier har altså økt antallet kjente genområder som disponerer for cøliaki fra 1 til 12. De aller fleste av disse områdene inneholder gener med immunologiske funksjoner. Disse nye genene bidrar imidlertid relativt lite til cøliakis arvelighet, og halvparten av arveligheten fortsatt er ukjent. Resultatene gir likevel ny innsikt i mekanismene bak utviklingen av cøliaki. Og noen av genene viser også assosiasjon til andre immunologiske sykdommer, slik at man kan snakke om generelle immunologiske risikogener.

Immunologer og genetikere som jobber med cøliaki går helt klart en spennende tid i møte.

## Litteraturhenvisninger

- 1: Sollid LM, Lundin KE: Sykdomsmekanismer ved cøliaki. Tidsskr Nor Legeforen. 2003 Nov 20;123(22):3230-3.
- 2: Fasano A, Catassi C: Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. Gastroenterology. 2001 Feb;120(3):636-51.
- 3: Kumar P and Clark M(eds): Clinical medicin, sixth edition. ISBN: 0-7020-27634, Elsevier Saunders, Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto 2005, pp 301-303.
- 4: Lundin KE, et al: Cøliaki – nye kliniske erkjennelser og diagnostiske hjelpemidler. Tidsskr Nor Legeforen. 2003 Nov 20;123(22):3226-9.
- 5: Walker-Smith JA, et al. Guidelines prepared by the ESPGAN Working Group on Acute Diarrhoea. Recommendations for feeding in childhood gastroenteritis. European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1997 May;24(5):619-20.
- 6: Sollid LM, et al: HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. Gastroenterology. 1993 Sep;105(3):910-22.
- 7: Løvik A, Lundin KE: Kostbehandling av cøliaki og dermatitis herpetiformis. Tidsskr Nor Legeforen. 2003 Nov 20;123(22):3237-40.
- 8: Green PH, Jabri B: Celiac disease. Annu Rev Med. 2006;57:207-21.
- 9: Sollid LM: Molecular basis of celiac disease. Annu Rev Immunol 2000;18:53-81
- 10: Ivarsson A: The Swedish epidemic of coeliac disease explored using an epidemiological approach--some lessons to be learnt. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2005 Jun;19(3):425-40.
- 11: Akobeng AK, et al: Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. Arch Dis Child. 2006 Jan;91(1):39-43.

- 
- 12: Greco L, et al: The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut*. 2002 May;50(5):624-8.
  - 13: Bevan S, et al: Contribution of the MHC region to the familial risk of coeliac disease. *J Med Genet*. 1999 Sep;36(9):687-90.
  - 14: Louka AS, Sollid LM: HLA in coeliac disease: unravelling the complex genetics of a complex disorder. *Tissue Antigens*. 2003 Feb;61(2):105-17.
  - 15: Nussbaum RL, McInnes RR and Willard HF: Thompson & Thompson, *Genetics in medicine*, Sixth edition. ISBN:0-7216-6902-6, W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, New York, St.Louis, Sydney, Toronto 2001, pp 289-309
  - 16: Hunt KA, van Heel DA: Recent advances in coeliac disease genetics. *Gut*. 2009 Apr;58(4):473-6.
  - 17: Castellanos-Rubio A et al. Combined functional and positional gene information for the identification of susceptibility variants in celiac disease. *Gastroenterology*. 2008 Mar;134(3):738-46.
  - 18: Xavier RJ, et al: Genome-wide association studies: a new window into immune-mediated diseases. *Nat Rev Immunol*. 2008 Aug;8(8):631-43.
  - 19: Wellcome Trust Case Control Consortium: Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007 Jun 7;447(7145):661-78.
  - 20: van Heel DA, et al: A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat Genet*. 2007, 39(7): 827–829.
  - 21: Hunt KA, et al: Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nat Genet*. 2008 Apr;40(4):395-402.
  - 22: Trynka G, et al: Coeliac disease-associated risk variants in TNFAIP3 and REL implicate altered NF-kappaB signaling. *Gut*. 2009 Aug;58(8):1078-83.
  23. Adamovic S, et al: Association study of IL2/IL21 and FcγRIIIa: significant association with the IL2/IL21 region in Scandinavian coeliac disease families. *Genes Immun*. 2008 Jun;9(4):364-7.

24. SS Amundsen, et al: Four novel coeliac disease regions replicated in an association study of a Swedish–Norwegian family cohort. *Genes Immun.* 2009 Aug 20. [Epub ahead of print]
25. Romanos J, et al: Six new coeliac disease loci replicated in an Italian population confirm association with coeliac disease. *J Med Genet.* 2009 Jan;46(1):60-3.
26. Koskinen LL, et al: Association study of the IL18RAP locus in three European populations with coeliac disease. *Hum Mol Genet.* 2009 Mar 15;18(6):1148-55.
27. Garner CP, et al: Replication of Celiac Disease UK Genome-Wide Association Study Results in a US Population. *Hum Mol Genet.* 2009 Jul 31. [Epub ahead of print]
28. Alexandra Zhernakova, et al: Novel Association in Chromosome 4q27 Region with Rheumatoid Arthritis and Confirmation of Type 1 Diabetes Point to a General Risk Locus for Autoimmune Diseases. *Am J Hum Genet.* 2007 Dec;81(6):1284-8.
29. Smyth DJ, et al: Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease. *N Engl J Med.* 2008 Dec 25;359(26):2767-77.
30. Coenen MJ, et al: Common and different genetic background for rheumatoid arthritis and coeliac disease. *Hum Mol Genet.* 2009 Jul 31. [Epub ahead of print]